

PREVALENCIA DE *Anaplasma marginale* EN BOVINOS DEL SECTOR LA PIÑATA, MUNICIPIO LA CAÑADA DE URDANETA, ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Prevalence of *Anaplasma marginale* in Cattle from La Piñata Sector, La Cañada de Urdaneta County, Zulia State, Venezuela

Dubraska Díaz, Zulayne Valera, Erleem de Andrade, Omaira Parra, Freddys Escalona, Roger Ramírez
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.
E-mail: dubraska_d@yahoo.com.

RESUMEN

Se realizó un estudio con la finalidad de determinar la prevalencia de *Anaplasma marginale* en bovinos del sector La Piñata, municipio La Cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela. Para ello fueron seleccionadas 12 fincas, con una población de 6.894 bovinos, evaluándose 174 muestras por medio de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y la observación de frotis de capa blanca. A través de la técnica de IFI, se obtuvo una prevalencia de 95,4% (166 animales positivos) para *Anaplasma marginale*; mientras que mediante la observación de frotis de capa blanca fue de 56,9% (99 animales positivos). No se encontraron diferencias significativas con relación a la presencia de *Anaplasma marginale* y el sexo o la edad de los animales. Todas las fincas incluidas en la investigación mostraron prevalencias de *Anaplasma marginale* iguales o mayores a 75%, indicando que la zona estudiada presenta una condición de estabilidad enzootica para este hemoparásito. La técnica de IFI resultó ser más efectiva con relación a la observación de frotis de capa blanca en la detección de animales infectados con *Anaplasma marginale*.

Palabras clave: Prevalencia, *Anaplasma marginale*, bovinos, inmunofluorescencia indirecta.

ABSTRACT

A study was made for the purpose of determining the prevalence of *Anaplasma marginale* in bovines of the La Piñata sector, La Cañada de Urdaneta county, Zulia state, Venezuela. Twelve (12) farms were selected, with a population of 6,894 bovines, and 174 samples were evaluated by the technique of indirect Immune-fluorescence testing (IFA) and observation of

buffy coating smears. Through the IFA technique, a prevalence of 95.4% (166 animals positive) for *Anaplasma marginale*, was observed; whereas with the buffy coating smear 56.9% (99 animals) proved positive. There were no significant differences between the presence of *Anaplasma marginale* and the sex or age of the animals. All farms included in the research showed prevalence of *Anaplasma marginale* equal to or greater than 75%, indicating that the zone studied presents a condition of enzootic stability. The IFA technique turned out to be more effective than buffy coating smears in the detection of animals infected with *Anaplasma marginale*.

Key words: Prevalence, *Anaplasma marginale*, bovine, indirect immune-fluorescence testing.

INTRODUCCIÓN

Anaplasma marginale es un microorganismo rickettsial que invade los eritrocitos de rumiantes, causando la enfermedad denominada anaplasmosis [4, 18]. Este microorganismo está ampliamente distribuido en países tropicales y subtropicales [2, 6, 15, 24]. En Venezuela, su presencia ha sido señalada en diferentes regiones, representando, junto con otras enfermedades hemotrópicas como babesiosis y trypanosomosis, un serio obstáculo al desarrollo de la industria ganadera del país [6, 15, 28, 32], motivado a las pérdidas económicas que ocasiona debido a la disminución de la producción láctea, a la reducción en la ganancia de peso, gastos en fármacos, atención veterinaria y mortalidad [2, 6, 26, 37]. La babesiosis y la anaplasmosis son responsables de un alto porcentaje de muertes de bovinos importados, así como también de animales nativos inmunosuprimidos. Toro indica [30, 37] que las pérdidas a nivel nacional fueron estimadas en cien millones de bolívares anuales, mientras que en Latinoamérica, las pérdidas causa-

das por hemoparásitos han sido estimadas en más de ochocientos millones de dólares anuales [37].

Anaplasma marginale es transmitido principalmente por garrapatas y otros insectos hematófagos, como moscas tabánidas [6, 8, 12, 18]. Se ha señalado que unas 20 especies de garrapatas podrían estar involucradas en la transmisión de este organismo rickettsial [33, 36]. Sin embargo es conveniente indicar que *Boophilus microplus* es garrapata de un solo hospedador por lo que el papel de la misma en la transmisión de la anaplasmosis bovina tiene fuertes evidencias en contra, teniendo menor importancia de la que tradicionalmente se le atribuyó [7]. La transmisión también puede darse por transfusiones sanguíneas con sangre infectada, por el uso de instrumentos quirúrgicos y agujas hipodérmicas contaminadas [6, 12, 32, 37]; y en algunos casos ha sido reportada la transmisión transplacentaria en el tercer trimestre de gestación [6, 25, 32].

Los bovinos jóvenes son considerados más resistentes a los efectos de una primoinfección por *A. marginale*, disminuyendo en estos casos los cuadros clínicos de la enfermedad y desarrollando una larga inmunidad [5, 18, 23]; sin embargo, se ha reportado que la anaplasmosis podría causar problemas graves en terneros de ciertas regiones en América del Sur [16]. Todas las razas de bovinos son susceptibles [12, 23]; sin embargo, el *Bos indicus* sufre en forma más leve la infección que el *Bos taurus* [5, 23].

Estudios realizados en rebaños con anaplasmosis, permiten describir dos situaciones epidemiológicas distintas [5, 18]. En primer lugar, una condición de estabilidad enzoótica donde una gran parte del rebaño desarrolla inmunidad al agente etiológico sin presentar enfermedad clínica, debido a que más del 75% de los becerros son expuestos a una carga suficiente del microorganismo antes de los 9 meses de edad conduciendo al desarrollo de preinmunidad y seroconversión, garantizando así un bajo riesgo de enfermedad clínica durante la edad adulta. En segundo lugar, puede ocurrir una condición de inestabilidad enzoótica cuando un número variable de animales (10-75%) llega a los 9 meses de edad sin desarrollar preinmunidad ni seroconversión, como consecuencia de una baja exposición al agente; esta situación puede aumentar significativamente el riesgo de la enfermedad en el rebaño. Por otra parte, en fincas donde menos del 10% de los becerros son expuestos al microorganismo antes de los nueve meses de edad, estos rebaños se convierten en susceptibles, pero con bajo riesgo a la enfermedad, debido a que la tasa de inoculación es insuficiente para infectar a los animales en su vida posterior.

La detección de *Anaplasma marginale* puede realizarse en el laboratorio, mediante la revisión de frotis sanguíneos utilizando diferentes colorantes comerciales, tales como Diff Quick Stain, Giemsa y Acridina Naranja, donde se observa un cuerpo denso en la periferia de los glóbulos rojos [19, 26, 27, 29]. Esta técnica permite diagnosticar principalmente los animales en fase aguda [6, 11, 14]. En el estado de portador es difícil la observación de los organismos en un frotis sanguíneo,

por lo que se hace necesario el empleo de técnicas más precisas y sensibles, tales como Fijación del Complemento, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), entre otras [6, 10, 11, 13, 16, 20, 24, 31, 38]. Esta última es una de las pruebas más utilizada, por ser económica, sencilla, sistemática y además por tener una alta sensibilidad y especificidad [16, 20, 21, 26, 35, 37, 38].

Debido a la poca información reportada hasta la fecha sobre la situación epidemiológica de la anaplasmosis bovina en el estado Zulia, el presente trabajo tiene como objetivo determinar la prevalencia de *Anaplasma marginale* en bovinos del sector La Piñata, municipio La Cañada de Urdaneta, estado Zulia, a través de la observación de frotis sanguíneos teñidos con Diff Quick Stain y mediante la técnica de IFI, comparando a su vez las dos técnicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y muestra

El estudio se realizó en 12 fincas lecheras y de doble propósito, ubicadas en el sector La Piñata, municipio La Cañada de Urdaneta, estado Zulia, con una población de 6.894 bovinos mestizos (Holstein, Pardo Suizo y Cebú) para el momento de la toma de muestras. Se elaboró una encuesta estructurada para captar información que permitió caracterizar el rebaño y cada uno de los animales muestreados. En la zona estudiada no se encontraron animales vacunados contra *Anaplasma centrale*.

Debido a que no existen reportes de prevalencia de anaplasmosis en el municipio La Cañada de Urdaneta, estado Zulia, se utilizó una prevalencia estimada de 50%, un nivel de confianza de 90% ($Z = 1,96$) y un margen de error de 7% para calcular el tamaño de la muestra, mediante la siguiente fórmula [22]:

$$n_0 = Z^2 \cdot p \cdot q / e^2 ; \text{ y para su corrección } n = n_0 \cdot n / n_0 + (n - 1),$$

Donde, n_0 es el tamaño de la muestra (población infinita), Z = nivel de confianza, p = prevalencia conocida, q = prevalencia esperada, e^2 = error máximo admisible, y n = tamaño de la muestra. Por lo tanto, se obtuvo $n = 137$.

Los animales fueron divididos en tres grupos etarios: Grupo I, animales entre 0 y 12 meses de edad; grupo II, animales entre 13 y 24 meses de edad y grupo III, animales mayores de 24 meses de edad.

Los valores de la prevalencia fueron determinados mediante la siguiente fórmula [22]:

$$P = \frac{np}{T} \times 100\%$$

Donde, P = seroprevalencia de *Anaplasma marginale* en bovinos, np = número de sueros positivos a la infección y T = número total de sueros analizados.

Toma y procesamiento de muestras

El muestreo se realizó durante los meses de junio y julio del año 2000. Se tomaron dos muestras de sangre por animal, mediante punción de la vena coccígea; una de ellas fue recolectada en tubo sin anticoagulante, para la obtención del suero; y la otra en tubo con anticoagulante EDTA (Ácido etilendiamino tetra acético), para realizar frotis de capa blanca [19]. Estos frotis se colorearon con Diff Quick Stain (Jorgensen Laboratories, Inc. Loveland, Colorado) y se observaron al microscopio óptico de luz con objetivo 100X.

Técnica de IFI

A las muestras de suero se les realizó la técnica de IFI usando como antígeno una cepa autóctona de *Anaplasma marginale* [26]. Los sueros de cada uno de los animales fueron diluidos en PBS (pH 7,2) con 0,05% de leche descremada [9] de manera secuencial (1:80 hasta 1:10240). Los controles positivos y negativos fueron diluidos en 1:80, los cuales fueron facilitados por la Unidad de Investigaciones Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. Estos sueros fueron probados por Parra y col. [26].

Se agregó 20µl de cada una de las diluciones al pozo correspondiente del frotis antígeno y se incubó en cámara húmeda a 37°C por 30 min. Los frotis antígenos fueron lavados con PBS (pH 7,2) con agitación por 30 min y secados al aire. Luego fueron incubados en cámara húmeda a 37°C por 30 min con el conjugado anti-IgG bovino que contiene Isotiocianato de fluoresceína (Sigma Diagnostic, FITC) a una dilución de 1:40. Posteriormente los frotis antígenos fueron lavados nuevamente con PBS (pH 7,2), contrateñidos con Eriochrome Black 1,65% (Sigma Diagnostic) y lavados de nuevo con agua destilada. Después fueron secados al aire y montados con glicerol y PBS (pH 7,2) a una relación de 9:1. Los frotis fueron observados en un microscopio para fluorescencia (Axioskop-Zeiss) con objetivo de inmersión de 100X y el título final correspondió a la dilución máxima donde la fluorescencia pudo ser detectada.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico SAS [34] utilizando tablas de frecuencias y la prueba de ji cuadrado para detectar diferencias significativas.

RESULTADOS

De las 174 muestras sometidas a observación en frotis de capa blanca, 99 (56,9%) resultaron positivas y 75 (43,1%) negativas a la presencia de *Anaplasma marginale*; mientras que a través de la prueba de IFI, 166 (95,4%) fueron positivas y 8 (4,6%) negativas, TABLA I y FIG. 1. Por otra parte, de las 75 muestras negativas a *Anaplasma marginale* por frotis de capa blanca, 67 (89,3%) mostraron resultados positivos al emplear la técnica de IFI; sin embargo, ninguna de las negativas a IFI resultó positiva al observar los frotis de capa blanca.

TABLA I
PREVALENCIA DE *Anaplasma marginale* EN BOVINOS DEL SECTOR LA PIÑATA, MEDIANTE LA PRUEBA DE IFI Y LA OBSERVACIÓN DE FROTIS DE CAPA BLANCA TEÑIDOS CON DIFF QUICK STAIN

	Frotis de capa blanca		IFI	
	Animales	%	Animales	%
Positivos	99	56,9	166	95,4
Negativos	75	43,1	8	4,59
Total	174	100	174	100

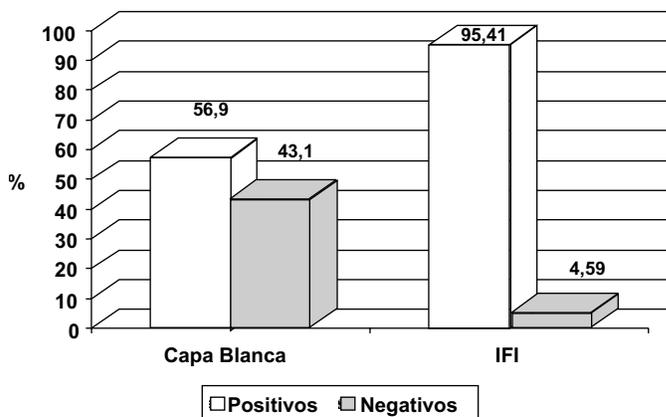


FIGURA 1. FRECUENCIA DE BOVINOS POSITIVOS Y NEGATIVOS A *Anaplasma marginale* EVALUADOS POR IFI Y FROTIS DE CAPA BLANCA, EXPRESADA EN PORCENTAJE.

En la TABLA II se observa la seroprevalencia de *Anaplasma marginale* en bovinos mestizos de las diferentes fincas estudiadas a través de la técnica de IFI. Se puede evidenciar que todas las fincas estudiadas presentaron una seroprevalencia igual o mayor de 75%.

Con relación al sexo, la seroprevalencia de *Anaplasma marginale* en machos y hembras fue de 93,75% y 96,03%, respectivamente, sin presentar diferencias significativas (P>0,05), FIG. 2.

Con respecto a la edad se obtuvo valores de positividad de 93,55%; 91,67% y 96,64% para los grupos I, II y III, respectivamente; determinándose que no existen diferencias significativas entre ellos (P > 0,05), TABLA III.

DISCUSIÓN

La prevalencia de *Anaplasma marginale* detectada por observación de frotis de capa blanca (56,9%) fue inferior a la obtenida a través de la técnica de IFI (95,4%), lo cual coincide con estudios previos como el realizado por Parra y col. [26], quienes observaron 56,7% de positividad en frotis de capa blanca y 100% con IFI; así mismo, Akinboade y Dipeolu [1] encontraron 8,9% y 68% de positividad, mediante el examen de

TABLA II
SEROPREVALENCIA DE *Anaplasma marginale* EN 12
FINCAS DEL SECTOR LA PIÑATA POR MEDIO
DE LA TÉCNICA DE IFI

Finca	Animales muestreados	Positivos	Negativos	Prevalencia (%)
01	15	15	0	100%
02	13	13	0	100%
03	26	24	2	92,31%
04	15	15	0	100%
05	20	20	0	100%
06	9	8	1	88,89%
07	8	8	0	100%
08	8	6	2	75%
09	15	14	1	93,33%
10	10	10	0	100%
11	26	25	1	96,15%
12	9	8	1	88,89%
TOTAL	174	166	8	95,4%

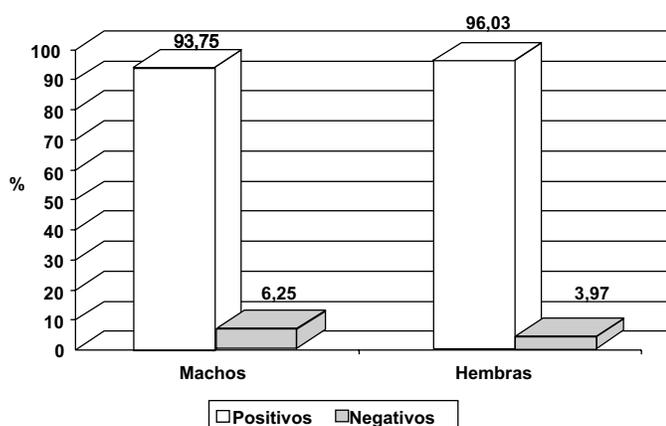


FIGURA 2. FRECUENCIA DE BOVINOS POSITIVOS Y NEGATIVOS A *Anaplasma marginale* MEDIANTE LA TÉCNICA DE IFI SEGÚN EL SEXO, EXPRESADA EN PORCENTAJE.

TABLA III
SEROPREVALENCIA DE *Anaplasma marginale*
EN BOVINOS MESTIZOS DEL SECTOR LA PIÑATA,
DE ACUERDO AL GRUPO ETARIO

Grupo Etario	Edad (meses)	Nº Animales	Positivos	
			N	%
I	0-12	31	29	93,55
II	13-24	24	22	91,67
III	> 24	119	115	96,64
Total		174	166	95,4

frotis sanguíneo e IFI respectivamente. Esto indica que los frotis sanguíneos presentan un menor grado de detección de animales parasitados, comparado con la técnica de IFI.

Los resultados obtenidos al utilizar la técnica de IFI en las 174 muestras de suero bovino corroboran los reportes de otras investigaciones [1, 16, 21, 25, 26, 38] donde se considera esta prueba serológica más eficiente para determinar animales portadores en comparación a los métodos tradicionales de observación de frotis sanguíneos.

Por medio de la técnica de IFI se obtuvo una seroprevalencia de *Anaplasma marginale* de 95,4% en el sector La Piñata del municipio La Cañada de Urdaneta. Este resultado es superior al reportado por Toro [37], quien para el año 1988 encontró una seroprevalencia de 78,7% en la región zuliana.

Con respecto a las fincas, se detectaron valores de seroprevalencia iguales o mayores a 75% en la totalidad de ellas, lo que pudiera indicar que en la zona de estudio existe una estabilidad enzoótica, con bajo riesgo para la ocurrencia de la enfermedad, siguiendo los conceptos emitidos por Carrique y col. [5] y Guglielmo [18]; lo cual indica que *Anaplasma marginale* es endémica en la zona estudiada.

Por otra parte, la seroprevalencia de *Anaplasma marginale* encontrada en este estudio difiere de la reportada en áreas ecológicas similares, como en la región Centro Occidental de Venezuela (estados Lara, Falcón, Yaracuy y Portuguesa), donde Toro reporta valores de 43,6% [37]; al igual que Alfaro y col. [2], quienes analizaron 1750 muestras de suero bovino de dos municipios del estado Monagas mediante la técnica de IFI, reportando una seroprevalencia de 49,54%.

En otros países con latitudes semejantes a las de Venezuela, como Colombia, se señalan seroprevalencias en diferentes zonas, que van desde un 50% hasta más del 90% [3, 23].

Con relación al sexo de los animales, no se observaron diferencias significativas entre los valores de seroprevalencias en machos y hembras, coincidiendo con Alfaro y col., quienes indicaron una prevalencia de 49,74% en machos y 49,52% en hembras [2].

En cuanto a la edad de los animales y la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma marginale*, las diferencias observadas entre los grupos etarios no tuvieron una significancia estadística, lo cual difiere con otros autores [2, 17, 23] quienes indican que los bovinos adultos presentan mayores tasas de prevalencia que los jóvenes.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se encontró una prevalencia de 96,4% para *Anaplasma marginale* por medio de la técnica de IFI, mientras que a través de frotis de capa blanca fue de 56,9%, indicando que este microorganismo es endémico en el sector La Piñata del municipio La Cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela. Por lo

que se recomienda a médicos veterinarios y productores del sector establecer medidas de control que permitan mantener buenos niveles de inmunidad sin que se presenten brotes de la enfermedad.

La zona estudiada presenta una condición de estabilidad enzoótica para *Anaplasma marginale*, lo que explica la alta seroprevalencia en los animales evaluados. En vista de esto, se recomienda realizar estudios de prevalencia en todo el estado Zulia, con la finalidad de obtener información epidemiológica actualizada sobre anaplasmosis bovina.

La técnica de IFI resultó ser más efectiva con relación a la técnica tradicional, frotis de capa blanca, en la detección de animales infectados con *Anaplasma marginale*; por lo que se debería implementar su uso en el diagnóstico de inmunidad de rebaños hacia este agente patógeno. Queda a criterio del médico veterinario el uso de la misma.

No se detectaron diferencias significativas en los valores de seroprevalencia de *Anaplasma marginale*, con respecto a la edad y el sexo de los animales.

Se hace necesario realizar investigaciones sobre la capacidad de transmisión de *Anaplasma marginale* por vectores mecánicos y biológicos en Venezuela, así como otros factores epidemiológicos asociados con la enfermedad a fin de poder establecer eficaces medidas de control.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento a la División de Investigación y a la Unidad de Investigaciones Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad del Zulia por el apoyo prestado para la realización de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AKINBOADE, O. A.; DIPEOLU, O.O. Comparison of blood smear and indirect fluorescent antibody techniques in detection of haemoparasite infections in trade cattle in Nigeria. **Vet. Parasitol.** 14(2): 95-104. 1984.
- [2] ALFARO, C.; TORO, B.; GARCÍA, F.; VALLE, A. Epidemiología de la Anaplasmosis bovina en el estado Monagas. Asociación con factores extrínsecos e intrínsecos del hospedador. **Veterinaria Tropical.** 23(1): 65-79. 1998.
- [3] BETANCOURT, J. A. Epidemiología de la Anaplasmosis en Colombia. **Memorias Seminario Internacional sobre Diagnóstico, Epidemiología y Control de las Enfermedades Hemoparasitarias.** Noviembre, 22 al 24. Palmira, Colombia: 12-40 p. 1989.
- [4] BLOOD, D.C.; STUDDERT, V. **Diccionario de Veterinaria.** Interamericana. McGraw-Hill: 59. 1988.
- [5] CARRIQUE, J. J.; WIDDOWSON, A. M.; CUELLAR, A. M.; RIBERA, H.; WALKER, A. R. Risk of babesiosis and

anaplasmosis in different ecological zones of Santa Cruz Department, Bolivia. **Vet. Parasitol.** 93: 29-38. 2000.

- [6] CONTRERAS, J. A. **Enfermedades de los Bovinos. Diagnóstico, Tratamiento y Control.** 1^{ra} Ed. Barquisimeto, Venezuela: 519-537 p. 1992.
- [7] CORONADO, A. Is Boophilus microplus the main vector of Anaplasma marginale? Technical note. **Revista Científica, FCV-LUZ.** XI(5): 408-411. 2001.
- [8] COSSIO-BAYUGAR, R.; RODRÍGUEZ, S. D.; GARCIA-ORTIZ, M. A.; GARCIA-TAPIA, D.; ABOYTES T. O, R. Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, México. **Prev. Vet. Med.** 32: 165-170. 1997.
- [9] DUMLER J. S.; ASANOVICH K. M.; BAKKEN J. S.; RICHTER P.; KIMSEY R.; MADIGAN J. E. Serologic Cross-Reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and Human Granulocytic Ehrlichia. **J. Clin. Microbiol.** 33(5): 1098-1103. 1995.
- [10] FIGUEROA, J. V.; ALVAREZ, J. A.; CANTO, G. J.; RAMOS, J. A.; MOSQUEDA, J. J.; BUENING, G. M. Comparative sensitivity of two tests for the diagnosis of multiple hemoparasite infection of cattle. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 791: 117-127. 1996.
- [11] FIGUEROA, J. V.; BUENING, G. M. Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick-borne hemoparasites of veterinary importance. **Vet. Parasitol.** 57(1-3)5: 75-92. 1995.
- [12] FRASER, C. M.; BERGERON, J.; MAYS, A.; AIELLO, S. **Manual Merck de Veterinaria.** 4^{ta} Ed. Merck CO., Inc. Rahway, N.J., E.U.A: 79-81 p. 1993.
- [13] GALE, K. R.; DIMMOCK, C. M.; GARTSIDE, M.; LEATCH, G. Anaplasma marginale: detection of carrier cattle by PCR-ELISA. **Int. J. Parasitol.** 26(10): 1103-1109. 1996.
- [14] GARCÍA, F. Técnicas directas para el diagnóstico de hemoparásitos. En: Giardina, S. y García, F. **Hemoparásitos: Biología y Diagnóstico.** Colección Cuadernos USB. Caracas, Venezuela: 117-142 p. 1990.
- [15] GIARDINA, S. Fisiopatología de la interacción Anaplasma-hospedador. En: Giardina, S. y García, F. **Hemoparásitos: Biología y Diagnóstico.** Colección Cuadernos USB. Caracas, Venezuela: 75-87 p. 1990.
- [16] GONZALEZ, E. F.; LONG, R. F.; TODOROVIC, R. A. Comparisons of the complement-fixation, indirect fluorescent antibody and card agglutination tests for the diagnosis of Bovine Anaplasmosis. **Am. J. Vet. Res.** 39(9): 1538-1541. 1978.
- [17] GUGLIELMONE, A. A. Epizootiología de las enfermedades hemoparasitarias de los vacunos. **Revista Cubana de Ciencias Veterinarias.** 24(2-3): 73-107. 1992.

- [18] GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of Babesiosis and Anaplasmosis in South and Central América. **Vet. Parasitol.** 57(1-3): 109-119. 1995.
- [19] JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Lea & Febiger. 4th Ed. Philadelphia: 21-86 p. 1986
- [20] LAWRENCE, J. A.; WHITELAND, A. P.; KAFUWA, P. T.; NJUGUNA, L. M. Improving the specificity of indirect immunofluorescence for the serological diagnosis of Bovine Anaplasmosis. **Onderstepoort J. Vet. Res.** 63(1): 53-55. 1996.
- [21] MADRUGA, C. R.; KESSLER, R. H.; SASTRE, A. M.; FABRICIO, E.; MIGUITA, C. T. Produção de antígeno e análise preliminar do teste de imunofluorescência indirecta para o diagnóstico de anticorpos contra *Anaplasma marginale*. **Pesquisa em Andamento**. 31(86): 1-4. 1986.
- [22] MÁLAGA, H. **Epidemiología Veterinaria**. Ediluz. Maracaibo, Venezuela: 177-180 p. 1990.
- [23] MORA, H. **Anaplasmosis**. Pfizer Salud Animal. Departamento Técnico. Bogotá, Colombia: 3-50 p. 1993
- [24] NIELSEN, K.; SMITH, P.; GALL, D.; ESHAIDE DE S. T.; WAGNER, G.; DAGER, A. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Anaplasma marginale* in bovine sera. **Vet. Parasitol.** 67(3-4): 133-142. 1996.
- [25] OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Bovine Anaplasmosis. Manual of Standards**. 3.2.7: 1-17. 1999.
- [26] PARRA, O.; ARRAGA DE A., C. M.; BASALO, A.; LEÓN, E.; GUILLÉN, A. T.; ZAPATA, D. I.; ALTUVE, M. E. Establecimiento de la técnica serológica inmunofluorescencia indirecta (IFI) como método de diagnóstico de la anaplasmosis bovina en la Policlínica Veterinaria de LUZ. **Revista Científica, FCV-LUZ**. V(1): 19-26. 1995.
- [27] RISTIC, M. Estructura del *Anaplasma*. **Memorias X Congreso Panamericano de Medicina Veterinaria**. Maracay, Venezuela: 3-7 p. 1971.
- [28] RIVERA, M. Biología de hemoparásitos de bovinos y equinos y de sus vectores. En: Giardina, S. y García, F. **Hemoparásitos: Biología y Diagnóstico**. Colección Cuadernos USB. Caracas, Venezuela: 13-31 p. 1990.
- [29] RIVERA, M. **Hemoparasitosis bovinas**. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. UCV. Ediciones Anauco, CA. 237 pp. 1996.
- [30] SCHROEDER, W. F.; LEON R., C. E.; TORO B. M.; LOPEZ, R. **Anaplasmosis: Prevención y Control**. Ministerio de Agricultura y Cría. Caracas, Venezuela: 13-45 p. 1969.
- [31] SHKAP, V.; BIN, H.; UNGAR-WARON, H.; PIPANO, E. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Anaplasma centrale* y *Anaplasma marginale*. **Vet. Microbiol.** 25(1): 45-53. 1990.
- [32] SMITH, R. D. Epidemiología de la anaplasmosis y babesiosis bovina. En: Giardina, S. y García, F. **Hemoparásitos: Biología y Diagnóstico**. Colección Cuadernos USB. Caracas, Venezuela: 53-71 p. 1990.
- [33] SOULSBY, E. J. L. **Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos**. Interamericana. 7^{ma} Ed. México. 766 pp. 1988.
- [34] SAS. Institute Inc. **Statistical Analysis System**. User's Guide. University North of California, USA. Ver. 6.04 1991.
- [35] STILLER, D.; COAN, M. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmiasis. **Vet. Parasitol.** 57(1-3): 97-108. 1995.
- [36] TEEL, P. D. Ticks. En: Willians R. E., Hall R. D., Broce A. B., Broce y Scholl P. J. **Livestock Entomology**. Jhon Willy and Sons. New York: 128-149 p. 1985.
- [37] TORO, B. Seroepidemiología de las hemoparasitosis en Venezuela. En: Giardina, S. y García, F. **Hemoparásitos: Biología y Diagnóstico**. Colección Cuadernos USB. Caracas, Venezuela: 35-49 p. 1990.
- [38] WILSON, A. J.; TRUEMAN, K. F.; SPINKS, G.; MCSORLEY, A. F. A comparison of 4 serological tests in the detection of humoral antibodies to anaplasmosis in cattle. **Aust. Vet. J.** 54(8): 383-386. 1978.